OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

93

G. LUCHETTI

TRASFORMAZIONI DETERMINATE NELLA COMPOSIZIONE DEL LATTE DAI SACCHAROMYCES CEREVISIAE ED ELLIPSOIDEUS

Estratto dai *Nuovi Annali dell' Agricoltura - Editi dal Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste.*

Anno XIV — 1934

1934 - XII

Dott. GIOVANNI LUCHETTI

Trasformazioni determinate nella composizione del latte dai Saccharomyces cerevisiae ed ellipsoideus

Estratto dai **Nuovi Annali dell'Agricoltura**
Editi dal Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste
Anno XIV - 1934

ROMA
ISTITUTO POLIGRAFICO DELLO STATO
LIBRERIA

1934 - XII

Dott. GIOVANNI LUCHETTI

Trasformazioni determinate nella composizione del latte dai Saccharomyces cerevisiae ed ellipsoideus

Estratto dai **Nuovi Annali dell' Agricoltura**

Editi dal Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste

Anno XIV - 1934

ROMA

ISTITUTO POLIGRAFICO DELLO STATO

LIBRERIA

1934 - XII

Tipografia Operaia Romana — Via Emilio Morosini, 17 — Roma, 1934-XII.

Dott. GIOVANNI LUCHETTI
Assistente nei Laboratorii di Patologia e Batteriologia
del R. Istituto superiore Agrario di Pisa

TRASFORMAZIONI DETERMINATE NELLA COMPOSIZIONE DEL LATTE DAI SACCHAROMYCES CEREVISIAE ED ELLIPSOIDEUS

(*Nota preliminare*)

È noto come, sia nel latte che nei suoi derivati, si rinvengano blastomiceti sporigeni ed asporigeni. La presenza di tali forme in particolari prodotti come quelli derivanti dalla fermentazione acido-alcoolica assume una certa importanza.

Le segnalazioni ormai comparse, della presenza di blastomiceti nei formaggi, sempre più numerose, fanno pensare che essi esercitino particolari uffici come nelle bevande acide, onde l'opportunità di indagare la natura e l'entità delle trasformazioni indotte nel latte, interessanti sì dal punto di vista teorico che pratico, fin qui punto od insufficientemente indagate.

Nella presente Nota (1) riferisco su alcune ricerche preliminari condotte sperimentando sul latte con *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces ellipsoideus*, rinvenuto quest'ultimo anche da Sacchetti in formaggio Stracchino.

Parte sperimentale.

Le colture furono allestite in latte, previamente sterilizzato per tre volte successive in giorni diversi in pentole di Koch, contenuto nella quantità necessaria e sufficiente alle ricerche, entro grandi re-

(1) A questo lavoro ha collaborato L. Bechi.

cipienti. L'inoculazione venne eseguita insemenzando con materiale prelevato con l'ansa di platino da patina sviluppata su agar-fagiuoli in tubi. Eseguita una completa analisi iniziale, le successive determinazioni vennero in gran parte effettuate al 5°, al 10° e al 15° giorno onde stabilire le eventuali variazioni ; in parte però vennero eseguite soltanto al 15° giorno. Parte delle determinazioni fu fatta quantitativamente, parte, invece, solo qualitativamente.

Più precisamente :

- Determinazioni quantitative
  - periodiche
    - 1*a* – Grado di acidità
    - *b* – Acidità totale
    - 2 – Grasso
    - 3 – Zucchero totale
    - 4 – Sostanze proteiche totali
  - finali
    - 5 – Caseina
    - 6 – Albumina
    - 7 – Estratto secco
    - 8 – Ceneri
    - 9 – Alcool
    - 10 – Ammoniaca
    - 11 – Acidità volatile
    - 12 – Acidità fissa
    - 13 – Curva di distillazione della acidità volatile
- Determinazioni qualitative finali
  - 14 – Glicerina
  - 15 – Aldeide etilica
  - 15 – Acido formico
  - 17 – Acido acetico

I metodi prescelti e seguiti durante lo svolgimento delle analisi furono i seguenti.

1. *Acidità totale e grado di acidità.* – Il grado di acidità del latte (corrispondente al volume in centimetri cubici di KOH N/4 occorrenti per la neutralizzazione di cc. 100 di latte) si ottenne neutralizzando con KOH N/10 25 cc. di latte addizionati di cc. 1 di fenolftaleina in soluzione alcoolica al 2 % e riportando a KOH N/4 ed a cc. 100 di latte. L'acidità totale fu ottenuta dal grado di acidità sapendo che cc. 1 di KOH N/4 neutralizza gr. 0,0225 di acido lattico.

2. *Grasso.* – La determinazione del grasso non si fece prelevando la quantità di latte dal recipiente grande ma inoculando a parte cc. 11 di latte in tubi da saggio. Ciò perchè non è possibile di prelevare con una pipetta un campione di latte che contenga la quantità di grasso in media contenuta nella massa, quando il grasso stesso si è raccolto alla superficie del liquido. La ricerca si fece col metodo Gerber.

3. *Zucchero totale.* – Lo zucchero totale si ricercò prelevando dal recipiente cc. 20 di latte che si diluivano con acqua fino a cc. 50-60, si acidificavano con acido acetico e si portavano a cc. 100 con acqua; si filtrava e sul filtrato si operava l'inversione del lattosio e la determinazione dello zucchero invertito col metodo di Fehling.

4. *Sostanze proteiche totali.* – Si ricercarono ossidando con acido solforico ed ossido di rame nel palloncino di Kyeldahl, cc. 20 di latte e determinando per distillazione l'azoto totale in essi contenuto. Dall'azoto, moltiplicando per 6,25 si ottenevano le sostanze azotate totali.

5. *Caseina.* – La caseina si coagulava dal latte (cc. 20) con soluzione satura di $MgSO_4$, si separava dal siero per filtrazione e sul coagulo si determinava col metodo esposto per le sostanze azotate totali.

6. *Albumina.* – Si otteneva dalla differenza tra sostanze azotate totali e caseina.

7. *Estratto secco.* – Si ricercò portando a secco cc. 50 di latte.

8. *Ceneri.* – Calcinando in muffola il residuo secco si ottenne il peso delle ceneri.

9. *Alcool.* – Per la determinazione dell'alcool si distillò un litro di latte reso leggermente alcalino con acqua di calce e raccogliendo circa cc. 500 di distillato. Su una parte aliquota di questo distillato si ricercò l'alcool col metodo Bodlinder modificato da Benedict e Norris (1) cioè ossidando l'alcool con acido cromico in presenza di acido solforico e confrontandone la colorazione con una scala colorimetrica preparata con diverse quantità di soluzione alcoolica all'1 %.

(1) American Chem. So., vol. 20, pag. 293.

10. *Ammoniaca.* – Si determinò su altra parte del distillato precedente col metodo di Nessler, operando per mezzo di un saggio di confronto con soluzione di un sale ammoniacale diluitissima, a titolo noto.

11. *Acidità volatile.* – Si ottenne il valore dell'acidità volatile distillando fino a secco cc. 500 di latte addizionati di altrettanta acqua, portando a cc. 1000 il distillato e titolandone una parte con soluzione N/100 di KOH. L'acidità volatile fu poi riportata ad acido acetico.

12. *Acidità fissa.* – Si ottenne riportando l'acidità volatile ad acido lattico e detraendola dall'acidità totale.

13. *Curva di distillazione degli acidi volatili.* – Per questa ricerca si operò col metodo Duclaux (2), sottoponendo a distillazione cc. 110 del liquido ottenuto dalla distillazione dell'acidità volatile e raccogliendone le prime 10 frazioni di cc. 10 ciascuna che si titolarono separatamente con KOH N/100. I relativi volumi di KOH impiegati furono poi riportati a percentuali del volume totale impiegato per le dieci frazioni.

14. *Glicerina.* – Questa e le seguenti ricerche furono eseguite, come si è detto, solo qualitativamente. Della presenza della glicerina nella sostanza in esame ci si accertò distendendo sopra un foglio di carta da filtro calce viva, facendovi cader sopra alcuni centimetri cubici di latte, filtrando e lasciando seccare all'aria. Poi si trattò calce e carta in un Soxhlet con alcool assoluto, quindi, dopo evaporazione dell'alcool, si trattò più volte con soluzione in parti uguali di alcool ed etere. Evaporato quindi il solvente e mescolato il residuo con borato sodico si espose alla fiamma con filo di platino : una colorazione verde denotò la presenza di glicerina ; inoltre si ebbe leggero odore di acroleina per aggiunta di bisolfato-potassico.

15. *Aldeide etilica.* – Ci si accertò della sua presenza nel latte fermentato aggiungendo pochi centimetri cubici del distillato ottenuto per la ricerca dell'alcool, piccole quantità di soluzione di fucsina 1/100.000 decolorata al sole. Tale reattivo dà, in presenza di aldeide etilica, anche in traccie, colorazione violacea.

---

(2) *Traité de Microbiologie.* Paris 1899.

16. *Acido formico.* – Fu ricercato qualitativamente sul distillato dell'acidità volatile traendo profitto dalle proprietà riduttive di questo acido sul permanganato potassico e sul nitrato d'argento.

17. *Acido acetico.* – Si ricercò sullo stesso distillato per mezzo della reazione cacodilica e del caratteristico odore aldeidico che emana in presenza di alcool etilico ed acido solforico.

Non si fecero determinazioni della densità del latte perchè è comprensibile che queste sono possibili su latte fresco e non hanno alcun valore su un latte fermentato, più o meno coagulato e da cui si è separato il grasso per affioramento.

Sono riportati nelle tabelle seguenti i risultati delle analisi, esprimendo tutti i valori per litro di latte fresco.

TABELLA I.

Analisi eseguite su latte fermentato con Saccharomyces cerevisiae.

N.	RICERCA	Iniziale	5° Giorno	10° Giorno	15° Giorno
1-*a*	Grado di acidità	7,46	9,84	11,36	11,52
1-*b*	Acidità totale (in acido lattico)	1,667	2,215	2,550	2,592
2	Grasso	30,—	28,5	28,—	27,8
3	Zucchero totale	41,2	35,3	34,2	33,5
4	Sostanze proteiche totali. .	39,20	34,56	32,41	32,12
5	Caseina	29,00	28,44	26,82	26,75
6	Albumina	10,20	6,12	5,39	5,37
7	Estratto secco	138,47	130,74	130,76	129,73
8	Ceneri	7,30	6,95	7,24	7,82
9	Alcool	—	—	—	0,24
10	Ammoniaca.	—	—	—	0,105
11	Acidità volatile (in ac. acetico)	—	—	—	0,172
12	Acidità fissa (in ac. lattico)	—	—	—	1,949
14	Glicerina	—	—	—	tr.
15	Aldeide etilica	—	—	—	tr.
16	Acido formico	—	—	—	tr. marcate
17	Acido acetico	—	—	—	tr. marcate

TABELLA II.

Analisi eseguite su latte fermentato con Saccharomyces ellipsoideus.

N.	RICERCA	Iniziale	5° Giorno	10° Giorno	15° Giorno
1-*a*	Grado di acidità	7,46	9,50	10,88	11,09
1-*b*	Acidità totale (in ac. lattico)	1,677	2,137	2,495	2,495
2	Grasso	30,00	27,50	27,—	27,—
3	Zucchero totale.	41,20	39,20	34,80	34,10
4	Sostanze proteiche totali. .	39,20	38,28	34,12	33,59
5	Caseina	29,—	28,64	27,94	27,88
6	Albumina	10,20	9,64	6,18	5,71
7	Estratto secco , ...	138,47	130,62	130,22	128,89
8	Ceneri	7,30	7,14	7,26	7,51
9	Alcool	—	—	—	0,35
10	Ammoniaca.	—	—	—	0,15
11	Acidità volatile (in acido acetico)	—	—	—	0,156
12	Acidità fissa (in ac. lattico)	—	—	—	1,91
14	Glicerina	—	—	—	tr.
15	Aldeide etilica	—	—	—	tr.
16	Acido formico	—	—	—	tr. marcate
17	Acido acetico	—	—		tr. marcate

Nelle tabelle III e IV sono riportati i valori ottenuti dalla titolazione delle diverse frazioni di distillato esaminate.

Nella prima riga è riportato il numero progressivo delle frazioni, nella seconda il numero di centimetri cubici di KOH N/100 occorsi per la saturazione dell'acidità di ciascuna frazione, nella terza la percentuale di acidità volatile distillata progressivamente, rispetto alla totale.

TABELLA III.

Distillazione dell'acidità volatile del latte fermentato con Sacch. cerevisiae.

Frazione N. . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Totale
KOH N/100 cc. . .	1,2	1,2	1,3	1,3	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	14,3
% di acidità . . .	8,4	16,8	25,9	35,-	45,1	55,2	66,4	77,6	88,8	100,	

TABELLA IV.

Distillazione dell'acidità volatile del latte fermentato con Sacch. ellipsoideus.

Frazione N. . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Totale
KOH N/100 cc. . .	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4	13,—
% di acidità . . .	8,5	16,9	26,1	35,4	45,4	56,1	67,7	78,5	89,2	100,	

Da queste tabelle confrontate con quelle di Duclaux si può desumere che l'acidità è in tutti e due i casi costituita sia da acido acetico e formico, determinati del resto qualitativamente, che dà un acido facilmente volatile compreso tra il propionico, il butirrico ed il valerianico. A priori sembrerebbe che dovesse trattarsi del butirrico che si ritrova tra i componenti normali di varie fermentazioni del latte ed anche di molte fermentazioni da saccaromiceti.

La quantità esigua di acidità volatile riscontrata nei due campioni di latte non permise altre ricerche qualitative ed i valori ottenuti nelle tabelle III e IV hanno un valore relativo in quanto, benchè si sia operato con KOH N/100, sarebbe bastato l'errore, del resto ammissibile, di 1/10 di cc. a cambiare enormemente i valori.

CONCLUSIONI.

Dalle prove di cui si è riferito si possono trarre le seguenti conclusioni :

I. – I due saccaromiceti sperimentati vivono e si sviluppano bene nel latte.

II. – Essi non producono acidità tale da provocare la coagulazione spontanea del latte.

III. – Questi saccaromiceti attaccano, forse per saponificazione, il grasso del latte e l'attacco varia col tempo e con il saccaromicete sperimentato : il *Sacch. cerevisiae* consuma nei primi 5 giorni il 5 % del grasso, nei primi 10 complessivamente il 6,66 % ed alla fine del 15° il 7,33 % ; il *Sacch. ellipsoideus* ha una azione leggermente più energica e consuma rispettivamente l'8,33 %, il 10 % ed il 10 % al 5°, 10° e 15° giorno.

IV. – Rispetto al lattosio il comportamento dei due saccaromiceti è pressochè identico, salvo una maggiore prontezza di attacco per il *Sacch. cerevisiae*. Il consumo di lattosio verificatosi fu :

	5° g.	10° g.	15° g.
Saccharomyces cerevisiae .	14,3 %	17,– %	18,7 %
» *ellipsoideus* .	4,8 %	15,5 %	17,2 %

ciò che dimostra una utilizzazione limitata (poco più di 1/6 del totale).

V. – Le sostanze proteiche del latte sono attaccate dai saccaromiceti in parola e l'utilizzazione dell'albumina è di gran lunga maggiore di quella della caseina. Più energico nell'attacco si dimostrò il *Sacch. cerevisiae* il quale consumò al 5°, 10° e 15° giorno rispettivamente 1,9 %, 7,5 % e 7,8 % di caseina e 40,– %, 47,1 % e 47,2 % di albumina.

VI. – La presenza di ammoniaca nel latte fermentato sta a dimostrare la capacità dei fermenti cimentati a peptonizzare le sostanze proteiche ed a spingerne la scissione fino a liberarla.

VII. – Non è da meravigliarsi della presenza di alcool nel latte in quanto i due saccaromiceti sono tipicamente produttori di alcool etilico, specialmente il *Sacch. ellipsoideus* che ha dato la quantità più elevata di alcool.

VIII. – L'acidità volatile è di una certa importanza in queste fermentazioni, tanto da ammontare al 23,4 % (*Sacch. ellipsoideus*) e al 23,1 % (*Sacch. cerevisiae*) della acidità totale.

IX. – L'aldeide etilica fu riscontrata qualitativamente tra i prodotti di fermentazione di ambedue i saccaromiceti.

X. – La glicerina, anch'essa trovata nel latte fermentato, lascia in dubbio sulla sua origine : è difficile, specie in assenza di una determinazione quantitativa, stabilire se essa provenga dalla saponificazione dei grassi oppure sia un prodotto intermedio della fermentazione alcoolica. Molto probabilmente essa è dovuta ad ambedue le cause.

XI. – I dati riferentisi all'estratto secco dalle ceneri non si presentano uniformi per le cause già viste della separazione del grasso dal latte con conseguente poca omogeneità del campione prelevato.

XII. – Le qualità organolettiche del latte non cambiano sostanzialmente: al gusto il latte rivela di aver perso il suo odore caratteristico che lo rende a molti poco accetto e di aver acquistato invece un aroma caratteristico che lontanamente ricorda il formaggio. L'acidità passa inavvertita al palato, tanto da potersi bere il latte senza aggiunta di zucchero o d'altro e senza provare il sapore astringente caratteristico ad esempio dello Yoghurt e di altri tipi affini di cagliate e latti fermentati con altri agenti.

ROMA — TIP. OPERAIA ROMANA
VIA EMILIO MOROSINI N. 17
:: :: 1934 - ANNO XII :: ::